

胀果甘草多糖 GiP-3 的结构分析及免疫活性测定

帕丽达·阿不力孜, 米仁沙·牙库甫, 陈橙, 丛媛媛*
(新疆医科大学 药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**分离纯化胀果甘草多糖,并研究其结构及免疫活性。**方法:**采用水提醇沉法提取胀果甘草粗多糖,经离子交换柱色谱和凝胶柱色谱分离纯化,高效凝胶渗透色谱(HPGPC)法、红外光谱(IR)法、气相-质谱(GC-MS)法和核磁共振氢谱(¹H-NMR)法分析其结构,噻唑蓝(MTT)法测定其对小鼠淋巴细胞和巨噬细胞增殖的影响。**结果:**胀果甘草根及根茎经水提醇沉,离子交换柱色谱和凝胶柱色谱分离纯化,得到平均相对分子质量为 2.1×10^4 Da的均一多糖组分GiP-3。对该多糖的结构和免疫活性的研究表明,GiP-3是由阿拉伯糖(Ara),鼠李糖(Rha),半乳糖(Gal)以1:0.12:18组成的中性阿拉伯半乳糖,其结构的主链由 $\rightarrow 3$)- α -Galp(1 \rightarrow 残基组成, $\rightarrow 5$)- α -Araf(1 \rightarrow 支链和少量 $\rightarrow 2,4$)- α -Rhap(1 \rightarrow 支链位于 α -Galp残基的O-6位上。GiP-3在体外对未经诱导和经刀豆蛋白(ConA)或脂多糖(LPS)诱导的小鼠脾细胞增殖均有促进作用,对RAW 264.7巨噬细胞的增殖也有一定的促进作用,与空白对照组均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**GiP-3为均一多糖,具有免疫增强活性。

[关键词] 胀果甘草; 多糖; 分离纯化; 结构分析; 免疫活性

[中图分类号] R282; R931; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0066-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018040066

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171127.0904.014.html>

[网络出版时间] 2017-11-27 9:04

Structural Analysis and Immune Activity Determination of Polysaccharide from *Glycyrrhiza inflata*

Palida · Abulizi, Mirensa · Yakufu, CHEN Cheng, CONG Yuan-yuan*
(School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify a polysaccharide fraction from *Glycyrrhiza inflata*, in order to analyze its basic chemical structure and immune activity. **Method:** Crude polysaccharide was extracted by the water extracting-alcohol precipitating method, and purified by DEAE cellulose-52 ion-exchange and Sepharose CL-6B gel column chromatography. Neutral homogeneous polysaccharide GiP-3 was purified from the water eluate fraction. HPGPC, IR, GC-MS and ¹H-NMR were applied to analyze the basic chemical structure. 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay was applied to evaluate the immune activity. **Result:** The molecular weight of GiP-3 was 2.1×10^4 Da. It was composed of arabinose, rhamnose and galactose, with the molar ratio of 1:0.12:18. The backbone of GiP-3 was mainly made up of 1,3-linked- α -Galp residues, and the side chains were composed of 1,5-linked- α -Araf residues and 1,2,4-linked- α -Rhap residues, and mainly linked at O-6 of α -Galp residue. The results of MTT assay showed that certain concentrations of GiP-3 could promote the proliferation of lymphocyte and RAW264.7 macrophage, with significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion:** GiP-3 is a homogeneous polysaccharide extracted from *G. inflata*, with an effect in enhancing immune responses.

[Key words] *Glycyrrhiza inflata*; polysaccharide; isolation and purification; structural analysis; immune activity

[收稿日期] 20170915(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360626)

[第一作者] 帕丽达·阿不力孜, 博士, 教授, 博士生导师, 从事维吾尔药的药效物质基础研究

[通信作者] *丛媛媛, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药、民族药的药效物质基础研究, E-mail: congyyxj@126.com

胀果甘草作为传统中药甘草的基源植物之一被历版《中国药典》收载,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药等功效^[1]。胀果甘草在中亚有分布,中国主要分布在新疆、甘肃等地,其中新疆的资源最为丰富,是新疆甘草的主要品种^[2]。有关胀果甘草的化学成分,文献报道主要为皂苷类以及黄酮类等^[3-7]。本课题组前期对胀果甘草中的多糖类成分进行了相关研究,发现胀果甘草多糖(*Glycyrrhiza inflata* polysaccharide, GiP)是其免疫调节作用的物质基础,已报道过粗多糖及分离纯化得到的 2 个相对分子质量约为 2 000 kDa 的中性多糖组分的理化性质和促脾细胞增殖活性^[8-9],另一个含量较高的酸性多糖也具有显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖、诱导脾淋巴细胞分泌 IL-2, TNF- α 的作用^[10]。

本文报道从胀果甘草中分离纯化得到的均一多糖组分 GiP-3,采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)法,IR,GC-MS,¹H-NMR 法分析其结构,并对其免疫活性进行初步研究,为该多糖的构效关系研究和进一步开发利用提供参考。

1 材料

甘草药材采自新疆和田,由新疆医科大学药学院热娜·卡斯木教授鉴定为为豆科植物胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* 的干燥根和根茎。

鼠李糖(*D*-rhamnose, 美国 Sigma 公司,批号 R3875-201115),阿拉伯糖(*L*-arabinose, 美国 Sigma 公司,批号 A3256-201211),木糖(*D*-xylose, 美国 Sigma 公司,批号 X2128-201208),甘露糖(*D*-Mannose, 美国 Sigma 公司,批号 M21474-201210),半乳糖(*D*-galactose, 美国 Sigma 公司,批号 G0625-201205),葡萄糖(*D*-glucose, 美国 Sigma 公司,批号 G8270-201310);多糖分子量测定用对照品 Dextran T(T10, T40, T70, T500, T2000)系列(美国 Pharmacia 公司,批号分别为 17-0250-01, 17-0270-01, 17-0280-01, 17-0320-01, 17-0330-01);硼氢化钠(上海精化科技研究所进口分装);间羟基联苯(美国 Sigma 公司);其他试剂均为国产分析纯。DEAE-52 型纤维素(美国 Whatman 公司),Sephacrose CL-6B 型琼脂糖凝胶(美国 Pharmacia 公司)。

TU-1901 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),AVATER-360 型红外光谱仪(美国尼高力仪器股份有限公司),INOVA-500 型核磁共振仪(美国 Varian 公司),Trace DSQ 型气相色谱-质谱仪(美国 Finnigan 公司),1100 系列高效液相色谱仪

和 HP6890N 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司)。昆明种小鼠,SPF 级,体质量(20 \pm 2) g,由新疆医科大学实验动物中心提供,动物合格证号[新医动字 SCXK(新) 2011-0003],符合动物伦理委员会要求。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法

2.1 胀果甘草多糖的提取分离 取干燥胀果甘草药材 5 kg,以 95% 乙醇回流提取 3 次,残渣按照文献^[8-9]中多糖的提取方法提取胀果甘草粗多糖,采用 Sevag 法除蛋白直至紫外扫描 260,280 nm 处无明显吸收峰,再以无水乙醇反复洗涤,对流水透析后,透析袋内部分冷冻干燥。

取透析袋内冻干所得粗多糖 10 g,用适量蒸馏水溶解,以 DEAE-52 型离子交换色谱柱分离,依次以蒸馏水及 0.1 ~ 0.6 mol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液洗脱,每个部位洗脱体积约为 3.0 L。将蒸馏水洗脱部分浓缩,以 Sepharose CL-6B 型琼脂糖凝胶柱进行纯化,以蒸馏水为流动相进行洗脱,对得到的各个流分用 HPGPC 检验纯度,合并保留时间一致的流分,浓缩后冻干,合并后样品再经过高效液相色谱法检测是否为单一的对称窄峰。该洗脱部位按保留时间先后共得到 4 个均一多糖组分,分别命名为 GiP-1,2,3,4,本文报道 GiP-3 的一级结构和活性。

2.2 GiP-3 的结构分析

2.2.1 纯度及相对分子质量的测定 采用 HPGPC 测定多糖纯度及相对分子质量^[11-12]。Shodex KS-300 凝胶色谱柱(8.0 mm \times 300 mm,7 μ m),流动相蒸馏水,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 60 $^{\circ}$ C,ELSD 检测器检测。

配制质量分数为 2% 的各对照品(葡萄糖, T10, T40, T70, T500, T2000)溶液,进行 HPGPC 检测。设定最大相对分子质量 T2000 的洗脱体积为柱的空体积 V_0 ,最小相对分子质量葡萄糖的洗脱体积作为柱的总体积 V_1 ,其他相对分子质量 Dextran 的洗脱体积 V_e ,以公式 $K_d = (V_e - V_0)/(V_1 - V_0)$ 计算,以 $\lg M_w$ 为横坐标 X , K_d 为纵坐标 Y ,制备标准曲线。配制质量分数为 2% 的 GiP-3 溶液,按上述方法进行检测,以其洗脱体积依上述标准曲线公式进行计算。

2.2.2 IR 分析 将待测样品适量,用溴化钾(KBr)压片后置于 IR 检测台上,在 4 000 ~ 800 cm⁻¹ 进行扫描,观察谱峰情况。

2.2.3 单糖组成的测定 采用文献^[13-14]所述方法对 GiP-3 进行完全酸水解,NaBH₄ 还原,再以乙酸

酞进行乙酰基衍生化,以单糖对照品为参照,采用 GC 法对 GiP-3 进行单糖组成的测定。

GC 检测条件:HP-5 毛细管色谱柱(0.32 mm × 30 m, 0.25 μm),程序升温(起始温度 170 °C,以 2 °C · min⁻¹ 升至 215 °C,然后 8 °C · min⁻¹ 升至 250 °C),火焰离子检测器(FID),检测温度 250 °C, H₂ 流速 30 mL · min⁻¹,空气流速 300 mL · min⁻¹,载气高纯 N₂,流速 45 mL · min⁻¹。

2.2.4 甲基化分析 采用文献[15-16]所述方法对 GiP-3 进行甲基化反应,IR 检测甲基化产物。当 IR 光谱中原样品 3 300 cm⁻¹ 左右强而宽的羟基吸收峰基本消失,而 2 900 cm⁻¹ 处的甲基峰显著增强时,表明样品已经完全被甲基化。

将已经完全甲基化的样品以 90% 甲酸解聚,进行完全酸水解还原乙酰基衍生化,采用 GC-MS 法分析糖残基。GC-MS 的条件为:DB-5 毛细管色谱柱(0.32 mm × 30 m),程序升温(起始温度 160 °C, 5 °C · min⁻¹ 升至 250 °C,保持 17 min),检测器 FID,检测温度 250 °C。

2.2.5 核磁共振氢谱(¹H-NMR)分析 取干燥 GiP-3 样品 50 mg 装入核磁管中,溶于 D₂O 1 mL,在核磁共振仪上进行¹H-NMR 光谱分析。分析温度 301.1 K,以 D₂O 峰 4.77 ppm 为内标。

2.3 GiP-3 的免疫活性测定

2.3.1 GiP-3 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响^[10,17]

无菌条件下取 10 周龄雌性 SPF 级昆明种小鼠脾脏,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗;加入适量淋巴细胞分离液于 200 目筛细胞上研磨,再加入适量 RPMI1640 培养液于 800 r · min⁻¹ 转速下离心 30 min;吸出淋巴细胞层,再加入 RPMI-1640 培养液 10 mL 洗涤,250 r · min⁻¹ 转速下离心 10 min 收集细胞。弃掉上清液,用完全培养液 5 mL 重悬细胞,37 °C,5% CO₂ 培养过夜。用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 1 × 10⁶ 个/mL,纯化后按空白组, GiP-3 组(50, 100, 200 mg · L⁻¹),刀豆蛋白 A(ConA)组(5 mg · L⁻¹),脂多糖(LPS)组(10 mg · L⁻¹)进行分组处理,每组设 4 个复孔。细胞于 37 °C,5% CO₂ 条件下培养 24 h,然后每孔加入 MTT(5 g · L⁻¹) 20 μL,继续培养 4 h 后吸弃 MTT,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,在酶标仪 570 nm 处检测其吸光度 *A*。增殖指数 = 处理组吸光度/空白对照组吸光度。

2.3.2 GiP-3 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响 取冻存于液氮中的 RAW264.7 巨噬细胞株,按文献

[18]方法复苏培养,取对数生长期细胞按 1 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ 个/mL 密度种板,纯化后按空白组, GiP-3 组(50, 100, 200 mg · L⁻¹), ConA 组(2 mg · L⁻¹), LPS(2 mg · L⁻¹)组进行分组处理,每组设 4 个复孔。细胞于 37 °C,5% CO₂ 条件下培养 24 h,然后每孔加入 MTT(5 g · L⁻¹) 20 μL,继续培养 4 h 后吸弃 MTT,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,在酶标仪 490 nm 处检测其 *A*^[19-20]。增殖指数 = 处理组吸光度/空白组吸光度。

2.3.3 统计分析 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 GiP-3 的纯度及相对分子质量 用标准葡聚糖 Dextran T 系列进行 HPGPC 检测,得系列数据,见表 1;并制作标准曲线,得回归方程为 $Y = -0.1606X + 1.348$ ($r = 0.9917$)。

表 1 Dextran T 系列 HPGPC 检测

Table 1 HPGPC results of Dextran T

Dextran T 系列	<i>M_w</i>	lg <i>M_w</i>	<i>t_R</i> /min
Glc	180	2.255	11.989
T10	1 × 10 ⁴	4.000	10.995
T40	4 × 10 ⁴	4.602	10.449
T70	7 × 10 ⁴	4.845	10.054
T500	5 × 10 ⁵	5.699	9.133
T2000	2 × 10 ⁶	6.301	6.712

GiP-3 的 HPGPC 色谱见图 1,显示单一对称峰(10.875 min),表明 GiP-3 为 1 个均一多糖组分,经以标准曲线计算,其重均分子量(molecular weight, *M_w*)为 2.1 × 10⁴ Da。GiP-3 用 0.1 mol · L⁻¹ 三氟乙酸(TFA)部分酸水解(100 °C, 1 h),水解产物进行透析,透析袋内的液体回收浓缩,通过 Sepharose CL-6B 柱色谱分离得到一个主要部分 GiP-3-P1, GiP-3-P1 经 HPGPC 检测,结果显示为单一对称峰位(10.897 min)所以认定其为 1 个均一多糖组分。通过与多糖相对分子质量标准曲线作比较,计算 *M_w* 为 1.9 × 10⁴ Da。

3.2 GiP-3 的 IR 分析 GiP-3 的 IR 光谱见图 2,主要吸收峰有 3 393, 2 932, 1 616, 1 423, 1 333, 1 244, 1 101 cm⁻¹,其中 3 393 cm⁻¹ 的宽峰是 O-H 的伸缩振动,2 932 cm⁻¹ 是 C-H 伸缩振动,1 616 cm⁻¹ 为糖环振动吸收峰,1 200 ~ 1 400 cm⁻¹ 为 C-H 键弯曲振

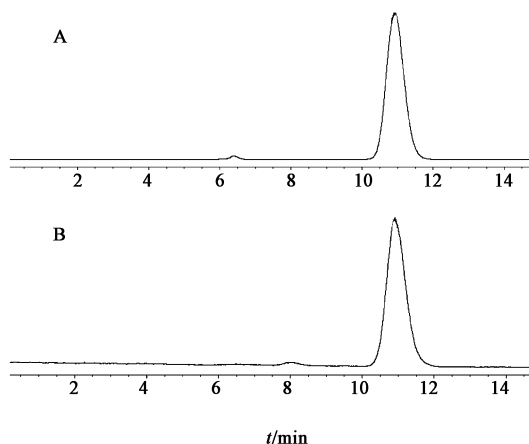


图 1 GiP-3(A)及其部分酸水解产物 GiP-3-P1(B)的 HPGPC 色谱
Fig.1 HPGPC chromatogram of GiP-3(A) and GiP-3-P1(B)

动吸收峰, $1\ 101\ \text{cm}^{-1}$ 为吡喃环的 C-O-C 和 C-O-H 的弯曲振动吸收峰, $1\ 244, 1\ 101, 1\ 019, 959\ \text{cm}^{-1}$ 构成的一组强吸收峰为吡喃型糖环的特征吸收峰, $850\ \text{cm}^{-1}$ 附近的一个吸收峰是 α -糖苷键的特征吸收峰。IR 谱图中 $810\ \text{cm}^{-1}$ 和 $870\ \text{cm}^{-1}$ 处无吸收, 表明 GiP-3 可能不含有甘露糖; 无 $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ 特征吸收峰, 表明该糖不含有糖醛酸成分。

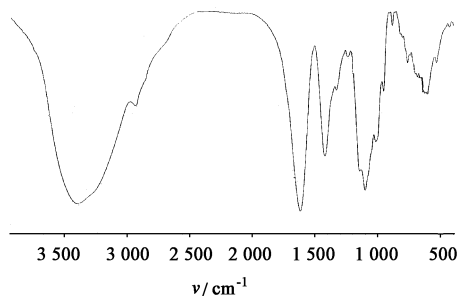
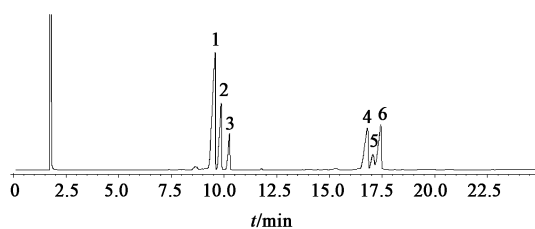


图 2 GiP-3 的 IR 光谱
Fig.2 IR spectrum of GiP-3

3.3 GiP-3 的单糖组成 GiP-3 及 GiP-3-P1 的完全酸水解产物经还原、乙酰化后, 进行 GC 分析, 见图 3~5。依据单糖对照品出峰时间确定单糖种类, 采用色谱峰面积归一化法计算各单糖摩尔比, 见表 2。结果表明, GiP-3 由 *L*-鼠李糖, *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖组成, 摩尔比为 0.12:1:18; GiP-3-P1 则由 *L*-阿拉伯糖和 *D*-半乳糖组成, 摩尔比为 1:20.06, 与 GiP-3 的组成相比, 阿拉伯糖残基含量有下降, 半乳糖残基含量与 GiP-3 中的糖残基接近, 没有检测到鼠李糖残基。该结果也提示, GiP-3 是以半乳糖链为主链结构, 比例较小的鼠李糖支链较易被水解。

3.4 GiP-3 的甲基化分析 GiP-3 及 GiP-3-P1 经 Needs 法甲基化的产物用 90% 甲酸解聚, 再完全酸水解, 经还原和乙酰化后进行 GC-MS 分析, 对甲基



1. 鼠李糖; 2. 阿拉伯糖; 3. 木糖; 4. 甘露糖; 5. 葡萄糖; 6. 半乳糖 (图 4, 5 同)

图 3 单糖对照品混合样衍生物的 GC

Fig. 3 GC chromatogram of alditol acetate from standard monosaccharide

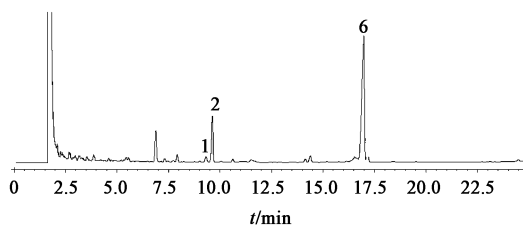


图 4 GiP-3 衍生物的 GC

Fig. 4 GC chromatogram of alditol acetate from GiP-3

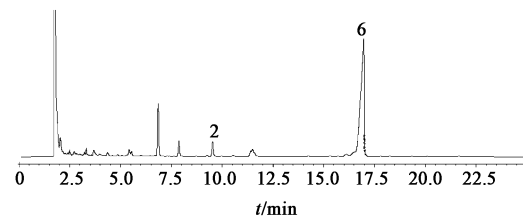


图 5 GiP-3-P1 衍生物的 GC

Fig. 5 Gas chromatogram of alditol acetate from GiP-3-P1

表 2 单糖对照品和 2 种多糖衍生物的保留时间

Table 2 Retention time of standard monosaccharide and derivatives of hydrolyzed GiP

名称	保留时间/min		GiP-3		GiP-3-P	
	单糖	混合对照品	保留时间 /min	物质的量比	保留时间 /min	物质的量比
鼠李糖	9.548	9.562	9.511	0.12	-	-
阿拉伯糖	9.926	9.855	9.810	1.00	9.826	1.00
木糖	10.226	10.247	-	-	-	-
甘露糖	16.756	16.794	-	-	-	-
半乳糖	16.969	17.058	16.974	18.00	16.980	20.06
葡萄糖	17.528	17.425	-	-	-	-

化后的离子碎片归属见表 3。结果表明 GiP-3 是一个多分支的阿拉伯半乳糖。其中阿拉伯糖残基以呋喃形式存在的, 存在方式包括末端和 1,5-连接; 半乳糖残基以吡喃环形式存在, 存在方式包括末端; 1,3-, 1,6-和 1,3,6-连接; 鼠李糖残基以吡喃环形式

存在,存在方式包括 1,2,4-连接。高含量的 1,3-连接及 1,6-,1,3,6-连接半乳糖残基显示了 GiP-3 是

以 1,3-连接半乳糖残基为主链,支链分支点位于半乳糖残基的 O-6 位。

表 3 GiP-3 和 GiP-3-P1 的甲基化分析

Table 3 Result of methylation analysis of GiP-3

甲基化的糖残基	离子碎片 (m/z)	连接方式	摩尔比	
			GiP-3	GiP-3-P1
2,3,5-tri-OCH ₃ Araf	87,101,117,129,145,161	Araf (1→	0.29	0.36
2,3-di-OCH ₃ Araf	87,101,117,129,189	→5) Araf(1→	0.69	0.74
2,3,4,6-tetra-OCH ₃ Galp	87,101,117,129,145,161,205	Galp (1→	1.09	0.83
2,4,6-tri-OCH ₃ Galp	87,101,117,129,143,161,173,201,233	→3) Galp(1→	12.33	15.63
2,3,4-tri-OCH ₃ -Galp	87,101,117,129,159,161,189,233	→6) Galp(1→	4.18	4.29
2,4-di-OCH ₃ Galp	87,101,117,129,139,159,189,201	→3,6) Galp(1→	1.29	1.18
3-OCH ₃ Rhap	87,101,117,129,143,159,189,203	→2,4) Rhap (1→	0.11	

GiP-3-P1 甲基化后的 GC-MS 分析结果显示,其中的阿拉伯糖残基仍以末端和 1,5-连接方式存在,但比例减小,显示阿拉伯糖链的断裂;半乳糖残基仍以末端,1,3-,1,6-和 1,3,6-方式连接,各连接比例与 GiP-3 中半乳糖连接方式比例相近,仅 1,3,6-连接略有减少;没有检测到鼠李糖残基。由此进一步证明 GiP-3 是以 1,3-连接半乳糖为主链,1,5-连接阿拉伯糖链和 1,2,4-连接鼠李糖链都与半乳糖主链存在一定的连接,而且连接点位于半乳糖的 O-6 位。

3.5 GiP-3 的 ¹H-NMR 分析 ¹H-NMR 谱中,α 型吡喃糖的异头碳上质子的化学位移通常高于 5.0,而 β 型则低于 5.0^[21]。在 GiP-3 的 ¹H-NMR 谱中,异头区的强信号为 δ:5.4 ~ 5.3 和 5.09 ~ 5.25,可见 GiP-3 中的糖以 α 构型为主,为 α-Galp 和 α-Araf 的异头氢信号,α-Rhap 的异头氢信号位于 δ:4.97 处,δ:1.19 为 α-Rhap 的 6-CH₃ 信号。大部分质子共振峰信号出现在 δ:3.6 ~ 4.0 左右。见图 6。

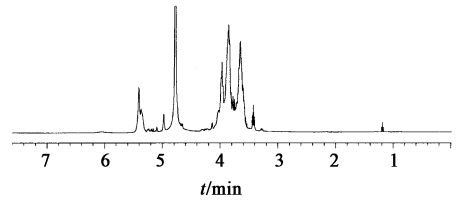


图 6 GiP-3 的 ¹H-NMR 图谱

Fig. 6 ¹H-NMR spectrum of GiP-3

3.6 GiP-3 的免疫活性

3.6.1 GiP-3 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 实验结果见表 4。与空白组比较,有丝分裂原 ConA 和 LPS 均能显著诱导小鼠脾淋巴细胞的增殖,差异具有统计学意义;实验组不同浓度胀果甘草多糖 GiP-3 单独应用即可刺激小鼠脾淋巴细胞增殖,100, 200 mg·L⁻¹ 组增殖效应显著 ($P < 0.05$);当 GiP-3 与 ConA 或 LPS 合用时,可在 ConA 或 LPS 基础上进一步提高脾淋巴细胞增殖率,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),并显示量效关系。该结果说明, GiP-B1

表 4 GiP-3 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 GiP-3 on mice lymphocytes proliferation *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

质量分数 /mg·L ⁻¹	GiP-3		GiP-3 + ConA		GiP-3 + LPS	
	A	增殖率/%	A	增殖率/%	A	增殖率/%
0	0.442 ± 0.042	-	0.649 ± 0.038 ²⁾	146.83	0.699 ± 0.04 ¹⁾	158.14
50	0.513 ± 0.031	116.06	0.671 ± 0.035 ²⁾	151.81	0.661 ± 0.075 ¹⁾	149.55
100	0.589 ± 0.069 ¹⁾	133.26	0.679 ± 0.034 ²⁾	153.62	0.637 ± 0.082 ¹⁾	144.12
200	0.687 ± 0.115 ¹⁾	155.43	0.709 ± 0.032 ²⁾	160.41	0.731 ± 0.088 ²⁾	165.38

注: ¹⁾与空白对照组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$); ²⁾与空白对照组比较具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。表 5 同。

能够独立活化小鼠脾淋巴细胞增殖,对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞的增殖或转化也具有明显促进作用。

3.6.2 GiP-3 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响

实验结果见表 5。对 RAW264.7 巨噬细胞给药处理 24 h 后,与空白对照组相比,有丝分裂原 ConA 和 LPS 均可促进 RAW264.7 巨噬细胞增殖作用,其中 ConA 的作用具有统计学差异 ($P < 0.05$); GiP-3 促

进 RAW264.7 巨噬细胞的增殖作用呈现出剂量效应关系,除低剂量组外,中、高剂量组 GiP-3 对 RAW264.7 巨噬细胞的增殖具有极显著 ($P < 0.01$) 的促进作用。

表 5 GiP-3 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Effects of GiP-3 on RAW264.7 macrophage proliferation

($\bar{x} \pm s, n=4$)

样品	剂量/mg·L ⁻¹	A	增殖率/%
空白	-	0.177 ± 0.014	-
ConA	-	0.269 ± 0.048 ¹⁾	151.98
LPS	-	0.212 ± 0.057	119.77
GiP-3	50	0.188 ± 0.023	106.21
	100	0.239 ± 0.009 ²⁾	135.03
	200	0.364 ± 0.058 ²⁾	205.65

4 结论

对提取得到的 GiP 采用离子交换色谱和凝胶色谱法进行分离纯化,纯化后的 GiP-3 重均分子量为 2.1×10^4 Da,单糖组成为 L-Rha, L-Ara, D-Gal, 摩尔比为 0.12:1:18;其结构的主链由 1,3 连接的半乳糖残基组成,支链分支位于半乳糖残基的 O-6 位上;支链分支大部分为 1,5 连接的阿拉伯糖链和少量 1,2,4 连接的鼠李糖。其促进脾脏淋巴细胞的增殖以及激活吞噬细胞的活性相对较高,具有潜在的免疫调节活性,可以开发成为无毒、高效的天然免疫调节剂,应用于食品和药品中。本实验结果可为胀果甘草多糖高级结构的解析和提高免疫力等作用机制和构效关系研究奠定基础。

通常阿拉伯半乳糖含较高比例的 β -D-Galp 和 α -L-Araf 残基,以及少量的不同级量的其他中性和酸性单糖残基,包括 α -L-Arap, α -L-Ahap, β -D-Glcp, β -D-Glcp 等^[22]。本实验中分离得到的阿拉伯半乳糖 GiP-3 具有 1,3-连接半乳糖残基构成的主链结构,在其 6-O 位连有不同比例的 1,5-连接的阿拉伯糖支链和 1,2,4-连接的鼠李糖支链,但其所有半乳糖单元均为 α -构型,与文献报道的有所不同,是否是一种新结构类型的阿拉伯半乳糖还需进一步的结构解析。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015: 86-87.

[2] 李晓瑾,杨卫东,文浩. 简析新疆甘草资源现状[J]. 中国现代中药,2002,4(2):26-29.

[3] 杨世林. 胀果甘草的化学成分[J]. 植物学报:英文版,1988,30(2): 176-182.

[4] 赵玉英,张如意,刘鸣. 胀果甘草化学成分的研究

(I)[J]. 北京医科大学学报:医学版,1990,22(4): 283-285.

[5] 邹坤,赵玉英,张如意,等. 胀果甘草化学成分的研究(II)[J]. 北京医科大学学报:医学版,1994,26(5): 1-4.

[6] ZOU K, DI F, ZHANG R Y, et al. Constituents from *Glycyrrhiza inflata* Bat(III)[J]. Nat Prod Res Dev, 1993,5(4):1-4.

[7] 邹坤,赵玉英,张如意. 胀果甘草中皂甙 I 和 II 的结构鉴定[J]. 药学学报,1994,29(5):393-396.

[8] 热娜·卡斯木,丛媛媛,屠鹏飞. 胀果甘草多糖的分离纯化及其理化性质[J]. 华西药学杂志,2008,23(4): 448-450.

[9] CONG Y Y, Rena Kasimu, DAI H, et al. A neutral polysaccharide from *Glycyrrhiza inflata* [J]. Chem Nat Compd, 2009,45(1):11-13.

[10] 热米拉·米吉提,丛媛媛,帕丽达·阿不力孜,等. 胀果甘草多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱导细胞因子的影响[J]. 中华中医药学刊,2016,35(7):1647-1649.

[11] 曲伟,刘庄,张照康,等. 毛尖茶叶多糖的提取分离及其活性测定[J]. 天然产物研究与开发,2016,28: 1262-1265,1278.

[12] 刘娟,屈效源. 块菌多糖的相对分子质量测定和单糖组成分析[J]. 中草药,2009,40(9):1380-1381.

[13] 钟思恩,黄光球,陈金仙,等. 三七叶多糖的提取分离及结构信息[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(21):50-54.

[14] 陈橙,丛媛媛,热米拉·米吉提. 薄层色谱法和气相色谱法分析 2 种侧耳多糖的单糖组成[J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(1):4193-4198.

[15] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州:浙江大学出版社,1999:293-294.

[16] 陈冠,赵振宇,傅予,等. 苦豆子多糖 SAP 的结构表征及其对 CT26 抗肿瘤活性研究[J]. 中草药,2017,48(6):1103-1107.

[17] 张逸,王旺,蔡寅,等. 苦瓜多糖的纯化、结构解析及其免疫调节和抗肿瘤活性研究[J]. 南京中医药大学学报,2017,33(1):33-41.

[18] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版公司,2007:64-78.

[19] WEI W, XIAO H T, BAO W R, et al. TLR-4 may mediate signaling pathways of *Astragalus* polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW246.7 cell [J]. J Ethnopharmacol,2016,179(8):243-252.

[20] 黄杰,章莹,严婧,等. 铁皮石斛多糖对脂多糖诱导的巨噬细胞免疫调节作用[J]. 中国药理学杂志,2017,52(7):548-552.

[21] 王小江,单鑫迪,胡明华,等. 青钱柳叶多糖的结构表征及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. 中草药,2017,48(8):1524-1528.

[22] 黄桂东,钟先锋. 阿拉伯半乳糖的研究进展[J]. 食品与机械,2006,22(4): 141-144.

[责任编辑 顾雪竹]